



EESTI MAAÜLIKOOL  
Metsandus- ja maaehitusinstituut

**Eliise Kass**

**MÄNNI-VÕRSEVÄHI TEKITAJA *DIPLODIA SAPINEA*  
LEVIKUST EUROOPAS JA KANADAS  
DIPLODIA SHOOT BLIGHT RECORDS IN EUROPE AND  
CANADA**

Bakalaureusetöö

Loodusvarade kasutamine ja kaitse õppekava

Juhendajad: Kaleb Adamson, PhD

Rein Drenkhan, PhD

Tartu 2018

|  |   |   |            |
|--|---|---|------------|
| Eesti Maaülikool   |   | Bakalaureusetöö lühikokkuvõte               |            |
| Kreutzwaldi 1, Tartu 51014   |   |   |            |
| Autor: Eliise Kass   |   | Õppekava: Loodusvarade kasutamine ja kaitse |            |
| Pealkiri: Männi-võrsevähi tekitaja <i>Diplodia sapinea</i> levikust Euroopas ja Kanadas  |   |   |            |
| Lehekülgi: 33  | Jooniseid: 0  | Tabeleid: 4                                 | Lisasid: 4 |
| Osakond/Õppetool:<br>ETIS-e Teadusvaldkond<br>ja CERC S-i kood:  | Metsakasvatuse ja metsaökoloogia õppetool<br>Metsapatoloogia, metsakasvatus, B430 |   |            |
| Juhendajad:  | PhD Kalev Adamson, PhD Rein Drenkhan  |   |            |
| Kaitsmiskoht ja -aasta:  | Tartu, 2018   |   |            |
| <p><i>Diplodia sapinea</i> on laialt levinud patogeen, mis lisaks puidu sinetuse tekitamisele nakatab käbisid, võrseid, okkaid ja juuri. Käesoleva töö eesmärgiks oli isoleerida Itaaliast, Serbiast, Gruusiast ja Kanadast <i>Diplodia</i> spp. proovid, testida kahe liigispetsiifilise PCR praimeripaari töökindlust, tuvastada isoleeritud patogeenide liigid ning määrata <i>D. sapinea</i> paarumistüübid.</p> <p>Kokku õnnestus 133-lt <i>Diplodia</i> spp. nakkusega käbilt isoleerida 111 patogeeni puhaskultuuri. Töös kasutatud praimerite paarid DiSapiF ja DiSapiR ning BotR ja DpF praimerid määrasid kumbki ühe negatiivse proovi, mis tegelikult oli sihtpatogeen. Lisaks määras DiSapi praimeripaar positiivseks ühe <i>D. scrobiculata</i> tüve. Seejuures välistasid praimerid <i>Botryosphaeria dothidea</i> ja <i>Massarina igniaria</i> tüved. DiSapi praimeripaar võimaldas korrektselt määrata 98,20% ning BotR ja DpF praimeripaar 99,09% seenetüvedest. Lisaks selgus, et nii Kanadas, Serbias kui ka Gruusias jagunesid statistiliselt paarumistüübid võrdselt, vaid Itaalia isolaatide puhul oli enam levinud paarumistüüp MAT2. Töö kokkuvõtteks selgus, et antud tulemuste põhjal on <i>D. sapinea</i> määramisel töökindlam BotR ja DpF praimeripaar.</p> |   |   |            |
| Märksõnad: <i>Diplodia pinea</i> , <i>Shpaeropsis sapinea</i> , paarumistüübid, liigispetsiifilised PCR praimerid  |   |   |            |

|   |            |  |               |
|---|------------|--|---------------|
| Estonian University of Life Sciences  |            | <b>Abstract of Bachelor's Thesis</b>     |               |
| Kreutzwaldi 1, Tartu 51014  |            |  |               |
| Author: Eliise Kass   |            | Curriculum: Natural Resources Management |               |
| Title: Diplodia shoot blight records in Europe and Canada   |            |  |               |
| Pages: 33   | Figures: 0 | Tables: 4                                | Appendixes: 4 |
| Department / Chair:   |            | Chair of Silviculture and Forest Ecology |               |
| Field of research and (CERCS S) code:   |            | Forest pathology, Silviculture B430      |               |
| Supervisors:  |            | PhD Kalev Adamson, PhD Rein Drenkhan     |               |
| Place and date:   |            | Tartu, 2018                              |               |
| <p><i>Diplodia sapinea</i> is a wide spread pathogen that infects cones, shoots, needles, roots and may even cause blue stain. The goals of the bachelor's thesis were to isolate pathogens from <i>Diplodia</i> spp. samples from Italy, Serbia, Georgia and Canada, to test two species-specific primer pairs reliability, identify species of isolated pathogens and to determine <i>D. sapinea</i> mating-types. Present bachelor's thesis is also contribution to population analysis of <i>D. sapinea</i> of northern hemisphere.</p> <p>There isolation resulted with 111 pure culture out of 133 cones with <i>Diplodia</i> spp. infection. Both used primer pairs DiSapiF, DiSapiR and BotR, DpF resulted both with one negative result for a target pathogen. In addition, DisapiF and DiSapiR primer pair determined <i>D. scrobiculata</i> as a <i>D. sapinea</i>. At that, primers resulted correctly negatively to <i>Botryosphaeria dothidea</i> and <i>Massarina igniaria</i>. DiSapi primer pair was able to determine pathogens with 98,20% and BotR, DpF primer pair with 99,09% accuracy. Besides that, in Canada, Serbia and Georgia mating-types divided statistically equally. Only in case of Italian isolates there were dominating mating-type MAT2. In conclusion, more reliable primer pair to determine <i>D. sapinea</i> was BotR, DpF.</p> |            |  |               |
| Keywords: <i>Diplodia sapinea</i> , <i>Shpaeropsis sapinea</i> , mating-types, species-specific PCR primers   |            |  |               |

# SISUKORD

|  |    |
|--|----|
| SISSEJUHATUS.....  | 5  |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....  | 7  |
| 2. MATERJAL JA METOODIKA .....   | 9  |
| 2.1 Algandmed.....   | 9  |
| 2.2 DNA eraldamine ja PCR analüüsid .....  | 10 |
| 2.2.1 DNA eraldamine .....   | 10 |
| 2.2.2 Liigispetsiifiline PCR ja geel elektroforees .....   | 11 |
| 2.2.3 ITS piirkonna sekveneerimine .....   | 11 |
| 2.3 Paarumistüüpide määramine.....   | 11 |
| 2.4 Statistiline analüüs .....   | 12 |
| 3. TULEMUSED.....  | 13 |
| 3.1 <i>Diplodia sapinea</i> liigispetsiifiliste praimerite võrdlus.....                                    | 13 |
| 3.2 <i>Diplodia sapinea</i> paarumistüüpide levik .....  | 14 |
| ARUTELU .....  | 16 |
| KOKKUVÕTE .....  | 18 |
| KASUTATUD KIRJANDUS.....   | 19 |
| LISAD .....  | 23 |
| Lisa 1. Kanada isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega.....   | 24 |
| Lisa 2. Serbia isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega. ....  | 28 |
| Lisa 3. Gruusia isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega.....  | 30 |
| Lisa 4. Itaalia isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega. .... | 32 |

## SISSEJUHATUS

*Diplodia sapinea* on üldlevinud haigustekitaja enam kui 30 okaspuu perekonnal, neist kõige vastuvõtlikumad on just männid (*Pinus*) (Sinclair, Lyon 2005). Patogeen on oma areaali järjest põhja poole nihutanud, näiteks võib tuua Baltikumi ja Fennoskandia (Adamson 2017; Oliva et al. 2013). Üheks peamiseks patogeenide levimise põhjuseks peetakse globaalset kaubandust (Anderson et al. 2004; Sturrock et al. 2011) ja kliima muutusi (Woods et al. 2005). *D. sapinea* on kottseen ja just Santini et al. (2013) järgi see seenerühm on enam näidanud üles invasiivsust võrreldes näiteks kandseentega.

Taimede impordi juures on äärmiselt oluline tuvastada patogeenid enne kui istutusmaterjal jõuab müüki. Sageli on seda keeruline teha, kuna istikutel puuduvad tihti igasugused välised haigussümptomid. See aga ei tähenda, et taimed ei võiks olla patogeeni kandjad. Näiteks eelpool nimetatud patogeenile on omane latentne faas, mis tähendab seda, et seen elab taimekudedes, tekitamata ühtegi sümptomit. Sellistel puhkudel on olulised molekulaarsed ehk DNA põhised meetodid patogeeni tuvastamisel. Näiteks, liigispetsiifilised praimerid suudavad tuvastada patogeene ka asümptomaatilistest proovidest. Selleks, et välja töötada õige praimer on neid vaja testida erinevatest geograafilistest piirkondadest pärit isolaatide peal.

*D. sapinea* levik on oluliselt suurenenud (Stanosz et al. 2005) ning seega on oluline teada haigustekitaja omadusi, et siis patogeeni levikut ohjata. Üheks tööriistaks patogeenide populatsioonide hindamisel on populatsioonigeneetika, mis pakub võimalusi tema levikuteede määratlemiseks, asurkonna elujõulisuse ning uute ja virulentsemate tüvede hindamiseks jne (McDonald, Linde 2002). Seente populatsioonigeneetika juurde kuulub ka paarumistüüpide määramine ning nende levik populatsioonis, mis annab võimaluse hinnata, kas antud seen paljuneb pigem suguliselt või suguta arengujärgu eostega.

Käesoleva töö teemaks on *Diplodia sapinea* leviku uurimine Kanadas, Gruusias, Serbias ja Itaalias, nendest maadest pärinevate isolaatide peal pole veel Eestis disainitud uusi primereid (DiSapiR ja DiSapiF) testitud ega võrreldud juba avaldatud praimeritega. Samas

on oluline antud piirkondade geneetilise info lisamine tulevaste populatsioonianalüüsi, hindamiseks patogeeni levikuteid põhjapoolkeral.

Eelnevast johtuvalt on antud töö eesmärgid järgmised:

1. isoleerida puhaskultuuri Itaaliast, Serbiast, Gruusiast ja Kanadast kogutud *Diplodia* spp. nakkusega proovid;
2. testida kahe liigispetsiifilise praimerite paari BotR ja DpF ( Smith, Stanosz 2006) ning DiSapiF ja DiSapiR (Riit 2014) töökindlust antud isolaatide peal;
3. tuvastada isoleeritud patogeeni liigid ning määrata *D. sapinea* paarumistüübid;
4. panustada isoleeritud patogeeni populatsioonidega Põhja-poolkera hõlmavasse populatsioonianalüüsi.

Autor avaldab tänu oma juhendajatele Kalev Adamson'ile ja Rein Drenkhan'ile labortööde juhendamise ja abistamise eest.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

*Diplodia sapinea* on laialdase levikuga patogeen, mida võib leida pea kõikidest riikides, kus mände (*Pinus*) kasvab ja kasvatatakse väljaspool algupärast keskkonda (Burgess, Wingfield 2002). *D. sapinea* põhjustab võrse-vähki, puu kuivamist, puidusinetust, tipust algavat puu suremist (Palmer et al. 1987; Swart, Wingfield 1991; Stanosz et al. 2005), juurtehaigusi (Wingfield, Knox-Davies 1980) ning juurekaela mädanikku (Waterman 1943; Punithalingam, Waterson 1970). Haigustunnuseid on leitud ligi viiekümnel männi (*Pinus*) liigil, kuid *D. sapinea* võib nakatada ka ebatsuugat (*Pseudotsuga*), kuuske (*Picea*), lehist (*Larix*), nulgua (*Abies*) (Sinclair, Lyon 2005). Tavapäraselt siseneb patogeen taime läbi vigastatud koha ning hakkab kiiresti arenema, põhjustades lõpuks taime surma. Küll aga ei pruugi *D. sapinea* latentses faasis mingeid sümptomeid põhjustada. Seda on täheldatud näiteks musta männi (*Pinus nigra*), hariliku männi (*P. sylvestris*) ja vaigumänni (*P. resinosa*) puhul (Stanosz et al. 1997; Flowers et al. 2001).

*Diplodia sapinea* globaalset levikut on seostatud ulatusliku patogeeniile vastuvõtlike männiliikide istutamisega uutele aladele (Piou et al. 1991; Stanosz et al. 2001). Lisaks mõjutab leviku kiirust ja intensiivsust ka peremeestaim, talvised temperatuurid ning suvised sademed (Fabre et al. 2011). Hetkel on teada, et patogeeniile kõige vastuvõtlikumad taimeosad on just käbid (Peterson 1977).

Euroopas avastati *D. sapinea* looduslikult saprofüüdina esimest korda 19. sajandil, kuid alates 1980. aastate lõpust on levik oluliselt laienenud (Piou et al. 1991). Esmakirjeldus Euroopas oli Desmariere'se linnas Prantsusmaal 1842. aastal (De Wet et al. 2003). Hetkel on teada, et *D. sapinea* on Lõuna-poolkeral üks enim imporditavaid patogeene männimetsades (Slippers, Wingfield 2007). Näiteks Euroopas toodi eelmisel sajandil Itaaliasse massiliselt musta mändi (*Pinus nigra*), eesmärgiga ära hoida maapinna erosiooni põllumajandusmaadel ning seejuures pandi mänd (*P. nigra*) kasvama aladele, millel on halvad füüsikalised, keemilised või kliimaatilised näitajad (Maresi et al. 2002; Wolynski et al. 2004).

Põhja-Itaalias on täheldatud *D. sapinea* laialdast levikut mustal männil (*P. nigra*) (Capretti 1956; Frigimelica et al. 2001; Feci et al. 2002; Maresi et al. 2002), mis toodi nendele aladele erosiooni vältimiseks (Maresi et al. 2002; Wolynski et al. 2004). Seetõttu on ka *D. sapinea*

uurimine sealse keskkonna suhtes väga oluline (Maresi et al. 2002; Wolynski et al. 2004). Kõige olulisem on seenpatogeeni mõju Trentino provintsis, kus musta männi istanduste pindala on ligi 12 000 ha (Capretti 1956; Eccel et al. 2002; Feci et al. 2002; Maresi et al. 2002). Enim on *D. sapinea* levik suurenenud aladel, mis pole musta männi tavapäraseid kasvupaigad (Capretti 1956; Eccel et al. 2002; Feci et al. 2002; Maresi et al. 2002).



## 2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1 Algandmed

Antud töö algandmed on kogutud 2016. ja 2017. aasta kevadel ja suvel Kanadast Niagara joa ja Hamiltoni linna lähedalt, Serbiast Novi-Sadi linna lähistelt, Gruusiast Telavi ning Ikalto linnade lähedalt ja Itaaliast Viterbo linna lähistelt. Kogutud käbid pärinesid peamiselt mustalt männilt (*Pinus nigra*), lisaks ka vaigumännilt (*P. resinosa*) ja harilikult männilt (*P. sylvestris*) (Tabel 1). Erinevatest paikadest koguti igalt sümptomitega puult üks käbi. Iga käbi koguti eraldi kilekotti ning märgistati puuliigi ja koordinaatidega. Proove säilitati -20 °C juures.

**Tabel 1.** *Diplodia sapinea* sümptomitega kogutud proovid

| Proovi<br>päritolumaa | Peremeestaim         | Kogumise<br>kuupäev | Proovide<br>arv | Koordinaadid |            |
|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------------|--------------|------------|
|                       |                      |                     |                 | N            | E          |
| Kanada                | <i>Pinus nigra</i>   | 07.05.2017          | 24              | 43.066087    | -79.067287 |
| Kanada                | <i>P. nigra</i>      | 07.05.2017          | 6               | 42.833582    | -80.446162 |
| Kanada                | <i>P. resinosa</i>   | 07.05.2017          | 14              | 42.833582    | -80.446162 |
| Kanada                | <i>P. sylvestris</i> | 08.05.2017          | 1               | 42.833582    | -80.446162 |
| Serbia                | <i>P. nigra</i>      | 17.03.2017          | 8               | 45.330277    | 19.873333  |
| Serbia                | <i>P. sylvestris</i> | 17.05.2016          | 5               | 45.333055    | 19.864444  |
| Serbia                | <i>P. sylvestris</i> | 17.05.2016          | 1               | 45.301666    | 20.035833  |
| Serbia                | <i>P. nigra</i>      | 17.05.2016          | 2               | 45.348611    | 19.867222  |
| Serbia                | <i>P. nigra</i>      | 17.05.2016          | 10              | 45.253333    | 19.977555  |
| Serbia                | <i>P. nigra</i>      | 17.03.2016          | 4               | 45.276666    | 19.971944  |
| Gruusia               | <i>P. nigra</i>      | 04.04.2017          | 4               | 41.919086    | 45.508758  |
| Gruusia               | <i>P. nigra</i>      | 04.04.2017          | 3               | 41.937253    | 45.380606  |

Tabel 1 järg

| Proovi<br>päritolumaa | <i>Peremeestaim</i> | Kogumise<br>kuupäev | Proovide<br>arv | Koordinaadid |           |
|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------|--------------|-----------|
|                       |                     |                     |                 | N            | E         |
| Gruusia               | <i>P. nigra</i>     | 05.04.2017          | 6               | 41.921552    | 45.501067 |
| Gruusia               | <i>P. nigra</i>     | 05.04.2017          | 5               | 41.908291    | 45.473124 |
| Gruusia               | <i>P. nigra</i>     | 04.04.2017          | 12              | 41.920120    | 45.456303 |
| Gruusia               | <i>P. nigra</i>     | 04.04.2017          | 10              | 41.911311    | 45.466944 |
| Itaalia               | <i>P. nigra</i>     | 23.11.2016          | 18              | 42.391010    | 12.180335 |

## 2.2 DNA eraldamine ja PCR analüüsid

Kogutud käbidelt otsiti võimalikke *Diplodia* spp. viljakehi ning neist isoleeriti patogeen puhaskultuuri. Esmalt puhastati käbid 96% etanooliga. Seejärel valiti 6 viljakeha, mis viidi virdeagarile (MEA), kolm viljakeha ühe söötmega Petri tassi kohta. Seejärel veeretati viljakeha mööda söötme pinda, et eralduksid eosed. Esmakultuure inkubeeriti toatemperatuuril umbes 7 päeva. Peale seda külvati kasvama läinud morfoloogiliselt *Diplodia* spp. tunnustega kultuurid ümber ning inkubeeriti kultuure toatemperatuuril ca 2 nädalat. Seejärel koguti kultuurist umbes 0,05 g mütseeli ning lisati 2 ml MCT tuubidesse. Kuni DNA eraldamiseni hoiti proove -20 °C juures.

### 2.2.1 DNA eraldamine

DNA eraldamiseks lisati seene mütseeliga tuubidesse 10-15 2,0 mm läbimõõduga metallist kuuli ning purustati homogenisaatoril (Retsch MM400, Saksamaa). See järel eraldati DNA Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit-iga (Thermo Fisher Scientific, Leedu) järgides tootjapoolset protokollit. Eraldatud DNA-d säilitati -20 °C juures PCR analüüsideni.

### 2.2.2 Liigispetsiifiline PCR ja geel elektroforees

PCR analüüsi käigus kasutati *Diplodia sapinea* liigispetsiifilisi praimereid BotR (5'-GCTTACACTTTCATTTATAGACC-3') ja DpF (5'-CTTATATATCAAACCTATGCTTTG-TA-3') (Smith, Stanosz 2006) ning DiSapiF ja DiSapiR (Riit 2014). Nii PCR segude valmistamisel kui ka termotsükleris järgiti originaalautorite poolseid protokolle. Saadud tulemusi kontrolliti 1% agarosgeelis, mida elektroforeesiti 75 V pinge juures 50 minutit. DNA olemasolu tehti kindlaks UV-kiirte abil transilluminaatoris. Saadud geelpilti vaadati ja töödeldi programmi Quantum (Vilber Lourmat SAS, Prantsusmaa) abil.

### 2.2.3 ITS piirkonna sekveneerimine

Liigi täpseks määramiseks DNA järjestuse alusel, sekveneeriti proove kasutades praimerit ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White 1990). PCR produktid saavutati enne sekveneerimist praimeritega ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardens, Bruns 1993) ja ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White 1990). ITS-PCR puhul järgiti praimerite autoritepoolseid protokolle. Proovid sekveneeriti Eesti Biokeskuses, Tartus. Saadud järjestusi töödeldi programmiga BioEdit. Liigi tuvastamiseks võrreldi tulemusi rahvusvahelises geenipangas The National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) olevate järjestustega.

## 2.3 Paarumistüüpide määramine

Genotüüpe, mis on võimelised suguliselt paljunema, nimetatakse paarumistüüpideks. Antud proovide paarumistüüpide määramiseks kasutati MAT-TYPE praimerite paare DIPM1F ja DIPM1R ning DIPHMGF (5'-ACAAAGTTCAGCGGAGCG-3') ja DIPHMGR (5'-CCTCCGCAGGTCATCAT-3') (Bihon et al. 2014). Termotsükleri protokoll ja PCR segud valmistati vastavalt autoripoolsetele protokollidele.

## **2.4 Statistiline analüüs**

Kontrollimaks, kas isoleeritud populatsioonides paarumistüüpide suhe erineb 1:1 suhtest, kasutati hüpoteeside testimiseks Exact binomial test- olulisusenivooga  $P=0,05$ .

### 3. TULEMUSED

Töös õnnestus haigustekitajaid isoleerida puhaskultuuri Kanadast 38, Serbiast 30, Gruusiast 30 ja 13 tüve Itaaliast (Tabel 2).

**Tabel 2.** Sümptomaatiliste proovide ja patogeeni isolaatide arvud päritoluriikide ja peremeestaimede kaupa

| Päritolu riik | Peremeestaim         | Proovide arv | Isolaatide arv | Paarumistüüp määrata* |
|---------------|----------------------|--------------|----------------|-----------------------|
| Kanada        | <i>Pinus nigra</i>   | 30           | 30             | 0                     |
| Kanada        | <i>P. resinosa</i>   | 14           | 8              | 3                     |
| Kanada        | <i>P. sylvestris</i> | 1            | 0              | 0                     |
| Serbia        | <i>P. nigra</i>      | 24           | 24             | 0                     |
| Serbia        | <i>P. sylvestris</i> | 6            | 6              | 1                     |
| Gruusia       | <i>P. nigra</i>      | 40           | 30             | 0                     |
| Itaalia       | <i>P. nigra</i>      | 18           | 13             | 0                     |

\*Kõiki paarumistüüpe ei õnnestunud paarumistüüpide praimerite abil määrata.

#### 3.1 *Diplodia sapinea* liigispetsiifiliste praimerite võrdlus

Kasutatud praimeritest DiSapiF ja DiSapiR (Riit 2014), võimaldasid õigesti tuvastada 98,20% analüüsitud isolaatidest, jättes see juures tuvastamata ühe Kanada päritolu *D. sapinea* tüve (DNA ID 12856), kuid pakkus vale positiivse tulemuse *Diplodia scrobiculata*-le (DNA ID 12855) (Lisa 1). BotR ja DpF (Smith, Stanosz 2006) praimerid võimaldasid 99,09% õiget patogeeni tuvastamist, jättes samuti ühe Serbiast pärit tüve *D. sapinea*-d tuvastamata (DNA ID 12864) (Lisa 2), kuid diskrimineeris samast seenperekoonnast väga lähedase patogeeni *D. scrobiculata* (Tabel 3). Itaalia puhul määrasid mõlemad praimeripaarid võrdselt korrektselt patogeene (Lisa 4).

Mõlemad praimeripaarid diskrimineerisid *Botryosphaeria dothidea* (DNA ID 12955) (Lisa 3) ja *Massarina igniaria* (DNA ID 12876) tüved, mis on DNA järjestuse poolest väga sarnased *D. sapinea*-ga. Seega mõlemad praimeripaarid töötasid samaväärselt, jättes kumbki tuvastamata ühe praimeri sihtpatogeeni tüve. Sellegi poolest võib välja tuua veidi kehvema tulemuse DiSapiF ja DiSapiR (Riit 2014), mis andis vale positiivse tulemuse *D. scrobiculata*-le.

Määramisel kindlaks tehtud *Botryosphaeria dothidea*-d on samuti sarnaselt *D. sapinea*-le leitud väliselt tervetelt puudel endofüüdina, mis siis peremeestaimele ebasoodsates tingimustes kiirelt arenema hakkab (Stanosz et al. 2005).

**Tabel 3.** Kahe *Diplodia sapinea* liigispetsiifilise praimeripaari negatiivsed- ja erinevad liigimäärangud

| DNA ID | BotR ja DpF tulemus | DiSapiF ja DiSapiR tulemus | Sekveneermise tulemus          |
|--------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 12855  | -                   | +                          | <i>Diplodia scrobiculata</i>   |
| 12856  | +                   | -                          | <i>D. sapinea</i>              |
| 12864  | -                   | +                          | <i>D. sapinea</i>              |
| 12876  | -                   | -                          | <i>Massarina iginaria</i>      |
| 12955  | -                   | -                          | <i>Botryosphaeria dothidea</i> |

### 3.2 *Diplodia sapinea* paarumistüüpide levik

Paarumistüüpide praimer võimaldas paarumistüüpe määrata 73st isolaadist 69. Mõlemad paarumistüübid on levinud kõikides analüüsitud neljas populatsioonis (Tabel 4). Seetõttu võib arvata, et kõigis uuritud piirkondades on *D. sapinea* suguline paljunemine ja seega uute geneetiliste tüvede tekkimine võimalik.

**Tabel 4.** *Diplodia sapinea* paarumistüüpide levik ning nende erinevus 1:1 suhtest riikide kaupa

| <b>Riik/<br/>maailmajagu</b> | <b>Isolaatide arv<br/>(N)</b> | <b>MAT1<br/>paarumistüüp</b> | <b>MAT2<br/>paarumistüüp</b> | <b>Täpse testi<br/>tulemused (P-<br/>väärtus)</b> |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|---|
| Kanada                       | 38                            | 20                           | 14                           | 0,392   |
| Serbia                       | 30                            | 13                           | 15                           | 0,851   |
| Gruusia                      | 30                            | 9                            | 20                           | 0,061   |
| Itaalia                      | 13                            | 2                            | 11                           | 0,022   |
| Euroopa kokku                | 73                            | 24                           | 46                           | 0,012   |

Testi tulemusest selgus, et statistiliselt on kahe paarumistüübi jagunemine võrdne nii Kanada, Serbia kui ka Gruusia isolaatide puhul (Tabel 4). Itaalia isolaatide puhul on p-väärtus väiksem kui 0,05 ehk paarumistüübid ei jagune võrdselt ning enam levinud on paarumistüüp MAT2. Ka kogu Euroopa riikide tulemused liites selgus MAT2 paarumistüübi arvuline ülekaal ning seda tõestas ka statistilise testi tulemus,  $P = 0,012$ .

## ARUTELU

Testides kahe *Diplodia sapinea* liigispetsiifilise praimerid töökindlust, selgus, et BotR ja DpF (Smith, Stanosz 2006) ning DiSapiF ja DiSapiR (Riit 2014) andsid proovi puhul kumbki ühe negatiivse tulemuse, mis tegelikult oli uuritav patogeen. Proovid, kus praimerid tuvastasid negatiivseid tulemusi, sekveneeriti ning määrati DNA järjestuse põhjal vastavad liigid. Mõlemal juhul leiti, et määratud tüvi on siiski *D. sapinea*, kuigi mõlemad praimerid määrasid siiski isolaadi negatiivseks. Samuti määras DiSapiF ja DiSapiR (Riit 2014) praimerid *D. scrobiculata* tüve positiivseks. See on tingitud aga sellest, et *D. sapinea* ja *D. scrobiculata* on sarnase DNA järjestusega (Phillips et al. 2013).

Sarnaselt antud tööle, on DiSapiF ja DiSapiR (Riit 2014) ning BotR ja DpF (Smith, Stanosz 2006) praimeripaaride töökindlust testinud oma töös ka Reelika Kalder. Eesti puhul selgus, et kahe liigispetsiifilise praimerid võrdluses oli *D. sapinea* määramisel töökindlam DiSapi praimeripaar ning sama praimeripaar andis Kaug-Ida puhul lausa 87% negatiivseid väärtuseid (Kalder 2015). Käesolevas töös näitas Kanada, Serbia, Gruusia ja Itaalia puhul paremat töökindlust BotR ja DpF praimeripaar, mis on tingitud DiSapiF ja DiSapiR praimeripaari eesmärgist tuvastada just Eestis *D. sapinea* patogeen (Riit 2014).

Lisaks tuvastasid mõlemad praimerid korrektselt negatiivseks kaks *D. sapinea*-st erinevat tüve, mis määrati sekveneerides Gruusia puhul *Botryosphaeria dothidea*-ks ja Serbia puhul *Massarina igniaria*-ks. *B. dothidea* on sarnaselt *D. sapinea*-le samuti üldlevinud patogeen ning võib esineda latentsses faasis sümptomiteta (Slippers, Wingfield 2007).

Lisaks on Gruusia Telavi linna mustade mändide (*Pinus nigra*) tervislik seisund väga halb (K. Adamson, suulised andmed). Antud juhul peeti peamiseks põhjuseks puude tervisliku seisundi hindamisel *D. sapinea*-d, kuid ühtlasi võib olla üheks võrsete suremise põhjuseks ka *Botryosphaeria dothidea*. Samuti ei saa välistada ka kahe patogeeni kompleks mõju linna puudele.

Paarumistüüpe täpse hüpoteeside testiga uurides selgus, et paarumistüübid ei jagunenud võrdselt vaid Itaalias, kus P-väärtus oli 0,022. Nii Kanadas, Gruusias kui ka Serbias jäi antud väärtus 0,05-st kõrgemale. Kuigi Euroopa riikide puhul kokku oli arvuliselt levinum MAT2



paarumistüüp, näitas statistiline test ebavõrdset paarumistüüpide jagunemist vaid Itaalias. Kanada isolaatide puhul oli arvukam MAT1 paarumistüüp, kuid statistiline test seda ei kinnitanud (Tabel 4).

Nii Euroopas kui ka Kanadas oli *D. sapinea* paarumistüüpide analüüs esmakordne, olles osa *D. sapinea* populatsiooni analüüsist.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti *Diplodia sapinea* levikut Kanadas ja Euroopas, täpsemalt Gruusias, Serbias ja Itaalias. *Diplodia* spp. nakkusega käbidelt (N=133) isoleeriti patogeeneid puhaskultuuri (N=111) ning seejärel selgitati välja nende paarumistüübid. Lisaks testiti kahte liigispetsiifilist praimerit isoleeritud tüvede peal, selgitamaks välja nende töökindlust.

Kahe praimeriga võrdluses ei tuvastanud BotR ja DpF (Smith, Stanosz 2006) ega DiSapi (Riit 2014) kumbki ühte *D. sapinea* isolaati Kanadast. Lisaks andis DiSapi (Riit 2014) vale positiivse tulemuse *D. scrobiculata* puhul. Kokkuvõtteks võib öelda, et DiSapi (Riit 2014) praimeripaar on mõneti kehvem *D. sapinea* tuvastamiseks, kuna võib anda valesid positiivseid tulemusi.

Paarumistüüpidest leidis kõikides uuritud populatsioonides mõlemat paarumistüüpi, seega suguline paljunemine on tõenäoline. Täpsemalt uurides selgus, et Kanadas, Serbias ja Gruusias jagunevad paarumistüübid statistiliselt võrdselt, statistiliselt tõestati ebavõrdset jagunemist vaid Itaalia populatsioonis. Euroopa riikides kokku oli statistiliselt oluliselt levinum MAT2 paarumistüüp. Seevastu oli Kanada isolaatide puhul levinum MAT1 paarumistüüp, kuigi statistika seda ei kinnitanud.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. **Adamson, K.** (2017). Invasiivsete okka- ja võrsehaiguste levik ja nende tekitajate populatsioonide võrdlev analüüs okaspuudel Põhja-Euroopas. Doktoritöö. Eesti Maaülikooli metsandus ja maaehitus instituut. Tartu. 164 lk.
2. **Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P.** (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 535–544.
3. **Bihon W, Wingfield MJ, Slippers B, Duong TA, Wingfield BD,** (2014). MAT gene idiomorphs suggest a heterothallic sexual cycle in a predominantly asexual and important pine pathogen. *Fungal Genetics and Biology* 62, 55–61.
4. **Burgess, T.; Wingfield, M. J.,** (2002). Quarantine is important in restricting the spread of exotic seed-borne tree pathogens in the southern hemisphere. *International Forestry Review*. 4, 56–65.
5. **Capretti, C.,** (1956). *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx agente del disseccamento di varie specie del genere *Pinus* e di altre conifere. *Accademia Italiana di Scienze Forestali*, 171–202.
6. **De Wet J, Burges T, Slippers B, Preisig O, Wingfield BD, Wingfield MJ.** (2003). Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationship between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research* 107, 557–566.
7. **Eccel, E.; Maresi, G.; Ambrosi, P.,** (2002). Deficit idrici e disseccamenti da *Sphaeropsis sapinea* su pino nero in Trentino. In: *Società Italiana di Selvicoltura ed Ecologia Forestale*. 3, 351–356.
8. **Fabre, B., Piou, D., Desprez-Loustau, M.L., Marcais, B.,** (2011). Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? *Global Change Biology*. 17, 3218–3227.

9. **Feci, E.; Battisti, A.; Capretti, P.; Tegli, S.**, (2002). An association between the fungus *Sphaeropsis sapinea* and the cone bug *Gastrodes grossipes* in cones of *Pinus nigra* in Italy. *Forest Pathology*. 32, 241– 247.
10. **Flowers, J., Nuckles, E., Hartman, J., Vaillancourt, L.** (2001). Latent infection of Austrian and Scots pine tissues by *Sphaeropsis sapinea*. - *Plant Disease*. Vol. 85, No. 10, 1107-1112.
11. **Frigimelica, G.; Campanelli, A.; Stergulg, F.**, (2001). Monitoring of widespread forest diseases in Friuli-Venezia Giulia (North-eastern Italy). *Journal of Forest Science*. 47, 81–84.
12. **Gardens, M. & Bruns, T. D.**, (1993). ITS primers with enhanced specificity for *basidiomycetes*— application to the identification of *mycorrhizae* and rusts. *Molecular ecology* 2(2), 113-118.
13. **Maresi, G.; Ambrosi, P.; Battisti, A.; Capretti, P.; Danti, R.; Feci, E.; Minerbi, S.; Tegli, S.**, (2002). Pine dieback by *Sphaeropsis sapinea* in Northern and Central Italy. *Forest Research Institute Res. Papers.*, Finland: IUFRO, 60–67.
14. **McDonald, B.A., Linde, C.**, (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 40, 349–379.
15. **Oliva J, Boberg J, Stenlid J.** (2013). First report of *Sphaeropsis sapinea* on Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Austrian pine (*P. nigra*) in Sweden. *New Disease Reports*. 27, 23.
16. **Punithalingam E, Waterson JM**, (1970). *Diplodia pinea*. In: CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria no. 273. Kluwer Academic Press, Kew, Surrey.
17. **Palmer, M. A.; Stewart, E. L.; Wingfield, M. J.**, (1987). Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States. *Phytopathology* 77, 944–948.
18. **Peterson GW**, (1977). Infection, epidemiology, and control of *diplodia* blight of Austrian, ponderosa, and Scots pines. *Phytopathology* 67, 511–4.
19. **Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., Crous, P. W.** (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture – *Studies in Mycology*. 76, 51–167.
20. **Piou D, Chandelier P, Morelet M**, (1991). *Sphaeropsis sapinea*, un nouveau probleme sanitaire des pins en France? *Revue Forestiere Francaise* 43, 203–13.

21. **Riit, T.** (2014). PCR praimerid taimede seenpatogeenide tuvastamiseks. Magistritöö. Tartu Ülikooli loodus- ja tehnoloogiateaduskond. Tartu. 59 lk.
22. **Santini A, Ghelardini L, De Pace C, DesprezLoustau ML, Capretti P, Chandelier A, Cech T, Chira D, Diamandis S, Gaitnieks T, Hantula J, Holdenrieder O, Jankovsky L, Jung T, Jurc D, Kirisits T, Kunca A, Lygis V, Malecka M, Mar- çais B, Schmitz S, Schumacher J, Solheim H, Solla A, Szabò I, Tsopelas P, Vannini A, Vettraino AM, Webber J, Woodward S, Stenlid J.,** (2013). Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytologist*. 197, 238–50.
23. **Sinclair WA, Lyon HH,** (2005). *Diseases of Trees and Shrubs*, 2nd edn. Ithaca, NY, USA: Comstock Publishing Associates.
24. **Slippers, B., Wingfield, M.J.,** (2007). *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21, 90-106.
25. **Stanosz GR, Smith DR, Guthmiller MA, Stanosz JC,** (1997). Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines. *Mycologia* 89, 525–30.
26. **Stanosz GR, Blodgett JT, Smith DR, Kruger EL,** (2001). Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist* 149, 531–8.
27. **Stanosz, G. R.; Smith, D. R.; Albers, J. S.,** (2005). Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries. *For. Pathol.* 35, 233–244.
28. **Sturrock RN, Frankel SJ, Brown AV et al.** (2011). Climate change and forest diseases. *Plant Pathology*, 60, 133–149.
29. **Swart, W. J.; Wingfield, M. J.,** (1991). Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease*. 75, 761–766.
30. **Waterman, A. M.** (1943). *Diplodia pinea*, the cause of a disease of hard pines. *Phytopathology*. 33, 1018-31.

31. **White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.,** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols : A guide to Methods and Applications*, 315-322.
32. **Wingfield MJ, Knox-Davies PS,** (1980). Association of *Diplodia pinea* with a root disease of pines in South Africa. *Plant Disease* 64, 221-223.
33. **Wolynski, A.; Maresi, G.; Ambrosi, P.; Luchi, N.; Capretti, P.,** (2004). *Sphaeropsis sapinea* e rimboschimenti di pino nero in Trentino. *Sherwood* 102, 13–17.
34. **Woods A, Coates KD, Hamann A.,** (2005). Is an unprecedented *Dothistroma* needle blight epidemic related to climate change? *BioScience*, 9, 761–769.

**LISAD**

**Lisa 1.** Kanada isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega.

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF ja DiSapiR</b> | <b>Paarumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| 12644         | +                  | +                         | 2                   |
| 12645         | +                  | +                         | 2                   |
| 12665         | +                  | +                         | 1                   |
| 12853         | +                  | +                         | 1                   |
| 12854         | +                  | +                         | 1                   |
| 12652         | +                  | +                         | 1                   |
| 12651         | +                  | +                         | 1                   |
| 12650         | +                  | +                         | 2                   |
| 12649         | +                  | +                         | 2                   |
| 12648         | +                  | +                         | 1                   |
| 12647         | +                  | +                         | 2                   |
| 12646         | +                  | +                         | 2                   |
| 12653         | +                  | +                         | 2                   |
| 12654         | +                  | +                         | 1                   |
| 12655         | +                  | +                         | 1                   |
| 12656         | +                  | +                         | 1                   |
| 12657         | +                  | +                         | 2                   |
| 12658         | +                  | +                         | 1                   |
| 12659         | +                  | +                         | 2                   |
| 12660         | +                  | +                         | 1                   |
| 12661         | +                  | +                         | 1                   |
| 12662         | +                  | +                         | 2                   |
| 12663         | +                  | +                         | 1                   |
| 12848         | +                  | +                         | ND                  |
| 12849         | -                  | +                         | ND                  |
| 12850         | +                  | +                         | ND                  |
| 12851         | +                  | +                         | 2                   |
| 12664         | +                  | +                         | 1                   |
| 12666         | +                  | +                         | 1                   |
| 12667         | +                  | +                         | 1                   |



| DNA ID | DpF ja BotR | DiSapiF ja DiSapiR | Paarumistüüp |
|--------|-------------|--------------------|--------------|
| 12668  | +           | +                  | 2            |
| 12852  | +           | +                  | 1            |
| 12855  | -           | +                  | 1            |
| 12856  | +           | -                  | 1            |
| 12857  | +           | +                  | 2            |
| 12858  | +           | +                  | 2            |
| 12859  | +           | +                  | 1&2          |
| 12860  | +           | +                  | 1            |
| 12861  | +           | +                  | 1            |
| 12862  | +           | +                  | 1            |
| 12863  | +           | +                  | 1            |
| 12864  | -           | +                  | 1            |
| 12865  | +           | +                  | 2            |
| 12866  | +           | +                  | 1            |
| 12867  | +           | +                  | 2            |
| 12868  | +           | +                  | 2            |
| 12869  | +           | +                  | 2            |
| 12870  | +           | +                  | 1            |
| 12871  | +           | +                  | ND           |
| 12872  | +           | +                  | 1            |
| 12873  | +           | +                  | 1            |
| 12874  | +           | +                  | 1            |
| 12875  | +           | +                  | 2            |
| 12876  | -           | -                  | ND           |
| 12933  | +           | +                  | 1            |
| 12934  | +           | +                  | 2            |
| 12877  | +           | +                  | 2            |
| 12878  | +           | +                  | 1            |
| 12879  | +           | +                  | 1            |

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF ja DiSapiR</b> | <b>Parumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| 12880         | +                  | +                         | 2                  |
| 12881         | +                  | +                         | 2                  |
| 12882         | +                  | +                         | 2                  |
| 12935         | +                  | +                         | 2                  |
| 12936         | +                  | +                         | 2                  |
| 12883         | +                  | +                         | 2                  |
| 12884         | +                  | +                         | 2                  |
| 12937         | +                  | +                         | 2                  |
| 12938         | +                  | +                         | 1                  |
| 12939         | +                  | +                         | 2                  |
| 12940         | +                  | +                         | 1                  |
| 12941         | +                  | +                         | 2                  |
| 12942         | +                  | +                         | 1                  |
| 12943         | +                  | +                         | 2                  |
| 12944         | +                  | +                         | 2                  |
| 12945         | +                  | +                         | 2                  |
| 12046         | +                  | +                         | 1                  |
| 12947         | +                  | +                         | 1                  |
| 12948         | +                  | +                         | 2                  |
| 12949         | +                  | +                         | 1                  |
| 12950         | +                  | +                         | 2                  |
| 12951         | +                  | +                         | 1                  |
| 12952         | +                  | +                         | 1                  |
| 12953         | +                  | +                         | 2                  |
| 12954         | +                  | +                         | 2                  |
| 12955         | -                  | -                         | ND                 |
| 12956         | +                  | +                         | 2                  |
| 12957         | +                  | +                         | 2                  |
| 12958         | +                  | +                         | 2                  |

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF ja DiSapiR</b> | <b>Paarumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| 12959         | +                  | +                         | 1                   |
| 12960         | +                  | +                         | 2                   |
| 12961         | +                  | +                         | 2                   |
| 12962         | +                  | +                         | 2                   |
| 12963         | +                  | +                         | 2                   |
| 12964         | +                  | +                         | 2                   |
| 12965         | +                  | +                         | 2                   |
| 12966         | +                  | +                         | 2                   |
| 12967         | +                  | +                         | 2                   |
| 12968         | +                  | +                         | 1                   |
| 12969         | +                  | +                         | 2                   |
| 12970         | +                  | +                         | 2                   |
| 12971         | +                  | +                         | 2                   |
| 12972         | +                  | +                         | 1                   |
| 12973         | +                  | +                         | 1                   |
| 12974         | +                  | +                         | 2                   |
| 12975         | +                  | +                         | 2                   |
| 12976         | +                  | +                         | 2                   |
| 12977         | +                  | +                         | 2                   |
| 12978         | +                  | +                         | 2                   |
| 12979         | +                  | +                         | 2                   |
| 12980         | +                  | +                         | 2                   |
| 12981         | +                  | +                         | 2                   |

**Lisa 2.** Serbia isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega.

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF ja<br/>DiSapiR</b> | <b>Paarumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|-------------------------------|---------------------|
| 12860         | +                  | +                             | 1                   |
| 12861         | +                  | +                             | 1                   |
| 12862         | +                  | +                             | 1                   |
| 12863         | +                  | +                             | 1                   |
| 12864         | -                  | +                             | 1                   |
| 12865         | +                  | +                             | 2                   |
| 12866         | +                  | +                             | 1                   |
| 12867         | +                  | +                             | 2                   |
| 12868         | +                  | +                             | 2                   |
| 12869         | +                  | +                             | 2                   |
| 12870         | +                  | +                             | 1                   |
| 12871         | +                  | +                             | ND                  |
| 12872         | +                  | +                             | 1                   |
| 12873         | +                  | +                             | 1                   |
| 12874         | +                  | +                             | 1                   |
| 12875         | +                  | +                             | 2                   |
| 12876         | -                  | -                             | ND                  |
| 12933         | +                  | +                             | 1                   |
| 12934         | +                  | +                             | 2                   |
| 12877         | +                  | +                             | 2                   |
| 12878         | +                  | +                             | 1                   |
| 12879         | +                  | +                             | 1                   |
| 12880         | +                  | +                             | 2                   |
| 12881         | +                  | +                             | 2                   |
| 12882         | +                  | +                             | 2                   |
| 12935         | +                  | +                             | 2                   |
| 12936         | +                  | +                             | 2                   |

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF ja DiSapiR</b> | <b>Paarumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| 12884         | +                  | +                         | 2                   |
| 12937         | +                  | +                         | 2                   |
| 12938         | +                  | +                         | 1                   |

**Lisa 3.** Gruusia isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega.

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF ja DiSapiR</b> | <b>Paarumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| 12938         | +                  | +                         | 1                   |
| 12939         | +                  | +                         | 2                   |
| 12940         | +                  | +                         | 1                   |
| 12941         | +                  | +                         | 2                   |
| 12942         | +                  | +                         | 1                   |
| 12943         | +                  | +                         | 2                   |
| 12944         | +                  | +                         | 2                   |
| 12945         | +                  | +                         | 2                   |
| 12046         | +                  | +                         | 1                   |
| 12947         | +                  | +                         | 1                   |
| 12948         | +                  | +                         | 2                   |
| 12949         | +                  | +                         | 1                   |
| 12950         | +                  | +                         | 2                   |
| 12951         | +                  | +                         | 1                   |
| 12952         | +                  | +                         | 1                   |
| 12953         | +                  | +                         | 2                   |
| 12954         | +                  | +                         | 2                   |
| 12955         | -                  | -                         | ND                  |
| 12956         | +                  | +                         | 2                   |
| 12957         | +                  | +                         | 2                   |
| 12958         | +                  | +                         | 2                   |
| 12959         | +                  | +                         | 1                   |
| 12960         | +                  | +                         | 2                   |
| 12961         | +                  | +                         | 2                   |
| 12962         | +                  | +                         | 2                   |
| 12963         | +                  | +                         | 2                   |
| 12964         | +                  | +                         | 2                   |
| 12965         | +                  | +                         | 2                   |
| 12966         | +                  | +                         | 2                   |
| 12967         | +                  | +                         | 2                   |

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF ja DiSapiR</b> | <b>Paarumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| 12968         | +                  | +                         | 1                   |

**Lisa 4.** Itaalia isolaatide PCR analüüsi tulemused Riit (2014) ja Smith & Stanosz (2006) praimeritega.

| <b>DNA ID</b> | <b>DpF ja BotR</b> | <b>DiSapiF<br/>DiSapiR</b> | <b>ja Paarumistüüp</b> |
|---------------|--------------------|----------------------------|------------------------|
| 12968         | +                  | +                          | 1                      |
| 12969         | +                  | +                          | 2                      |
| 12970         | +                  | +                          | 2                      |
| 12971         | +                  | +                          | 2                      |
| 12972         | +                  | +                          | 1                      |
| 12973         | +                  | +                          | 1                      |
| 12974         | +                  | +                          | 2                      |
| 12975         | +                  | +                          | 2                      |
| 12976         | +                  | +                          | 2                      |
| 12977         | +                  | +                          | 2                      |
| 12978         | +                  | +                          | 2                      |
| 12979         | +                  | +                          | 2                      |
| 12980         | +                  | +                          | 2                      |
| 12981         | +                  | +                          | 2                      |



**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

**ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Eliise Kass,

(sünniaeg 27/november/1995 isikukood 49511276513)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö  
MÄNNI-VÕRSEVÄHI TEKITAJA *DIPLODIA SAPINEA* LEVIKUST EUROOPAS JA  
KANADAS,  
mille juhendajad on Kalev Adamson ja Rein Drenkhan,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

- 2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
- 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

\_\_\_\_\_  
(allkiri)

Tartu, 24.05.2018

---

**Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Luban lõputöö kaitsmisele.

\_\_\_\_\_  
(juhendaja nimi ja allkiri)

\_\_\_\_\_  
(kuupäev)

\_\_\_\_\_  
(juhendaja nimi ja allkiri)

\_\_\_\_\_  
(kuupäev)